

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Daniel Panchártek

Cis a trans elementy uplatňující se v odezvě rostlin na sucho
(*se zvláštním zřetelem na regulaci fotosyntetických genů*)

Cis and trans elements in plant response to drought
(*with a particular focus on photosynthetic genes*)

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Dana Holá Ph.D.

Praha, 2011

Děkuji své školitelce RNDr. Daně Holé Ph.D. za vstřícnost, trpělivost a cenné rady během psaní této práce. Rád bych také poděkoval členům laboratoře genetiky rostlin za příjemné pracovní prostředí.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.4.2011

Podpis

Obsah

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
1. Úvod.....	3
2. Reakce rostlin na sucho – hlavní signální dráhy a mechanismy regulace genové exprese	4
2.1. Regulon AREB/ABF.....	4
2.2. Regulon MYC/MYB.....	6
2.3. Regulony nezávislé na kyselině abscisové.....	7
2.3.1. Regulon CBF/DREB.....	7
2.3.2. Regulon ZF-HD/NAC.....	8
2.4. Proteinkinázy třídy SnRK2.....	10
2.5. Reakce rostlin na další abiotické stresory.....	10
3. Reakce rostlin na sucho - regulace exprese genů spjatých s fotosyntézou..	12
3.1. Transkripční faktory StZ a AZF.....	13
3.2. Transkripční faktory HvMCB.....	13
3.3. Transkripční faktor CCA1.....	14
3.4. Transkripční faktor HY5.....	14
3.5. Transkripční faktor HRD.....	15
3.6. Transkripční faktory DOF.....	15
3.7. Úloha transkripčních faktorů v ochraně fotosyntetického aparátu proti působení ROS.....	16
4. Závěr.....	17
5. Seznam použité literatury.....	18

Abstrakt

Abiotické stresory jako sucho, vysoká koncentrace soli či chlad dokážou velkou měrou ovlivnit vývoj a růst rostlin. *Cis* a *trans* elementy jsou jednou z možností, jak mohou rostliny regulovat svůj metabolismus v případě, kdy se jejich aktuální životní podmínky změní v nepříznivé. Tímto způsobem je indukována exprese řady genů, které nefungují pouze ve smyslu navození tolerance, ale i jako obecná odpověď na tyto stresory. Těchto dějů se účastní velká škála transkripčních faktorů a dalších *trans* faktorů, které se často vážou na specifické sekvence v promotorech - *cis* elementy. V posledních letech bylo provedeno mnoho prací na toto téma, sucho ale zůstává stále jednou z nejméně probádaných oblastí. Přesto byly popsány hlavní signální dráhy a komplexy kaskád směřující k regulaci exprese cílových genů. Některé z těchto cílových genů souvisejí s fotosyntetickým aparátem a jejich regulace může u rostlin stresovaných suchem výrazně ovlivnit účinnost fotosyntézy. Tato práce stručně popisuje hlavní *cis* a *trans* elementy rostlin uplatňující se v odezvě na sucho (se zvláštním zřetelem právě na regulaci fotosyntetických genů).

Klíčová slova: sucho, genová exprese, *cis*-element, transkripční faktor, kyselina abscisová, fotosyntéza, promotor.

Abstract

Abiotic stresses, such as drought, high salinity and cold can strongly affect plant development and growth. *Cis* and *trans* elements are one of the options how plants regulate their own metabolism in those cases. That's the way how the expression of many target genes is induced. The products of these genes function not only in stress tolerance but also in general stress response. Many transcription factors and regulatory proteins (*trans* elements) are involved in these adaptations; those often interact with specific sequences in gene promoters (*cis* elements). Recently, a progress has been made in analyzing the signal paths and complex cascades of gene expression regulation, although a little is still known about this regulation during drought conditions. Some of these target genes code products participating in photosynthesis and the regulation of their expression can significantly affect this process. This essay briefly describes main *cis* and *trans* elements of plant response to drought (with a particular focus on the regulation of photosynthetic genes).

Keywords: drought, gene expression, *cis*-element, transcription factor, abscisic acid, photosynthesis, promoter.

1. Úvod

Sucho je jedním z nejvýznamnějších abiotických stresorů, jemuž musí rostliny čelit. V průběhu evoluce tudíž vyvinuly celou řadu mechanismů, kterými jsou schopny se s tímto stresovým faktorem vypořádat. Jedná se jak o okamžité reverzibilní reakce spíše fyziologického rázu, tak i o dlouhodobé reakce, často spojené s charakteristickými změnami genové exprese. Mechanismy regulace genové exprese jsou obvykle založeny na existenci *cis*-vazebných elementů v regulačních oblastech genů a jím příslušejících *trans* elementů, tedy transkripčních faktorů. Skupina všech genů, jejichž míra exprese je kontrolována totožným typem transkripčního faktoru, je označována jako regulon (Saibo et al., 2009). Aklimace rostlin na sucho mohou mít nejen krucální význam pro přežití rostlinného organismu, ale nezdědka vedou i k efektivnějšímu využití všech dostupných živin nebo zkrácení generační doby vedoucí k dřívější produkci semen. Tato práce má ve své první části podat přehled o současných znalostech molekulárních mechanismů regulace genové exprese, související s obecnou reakcí rostlin na sucho, a v druhé části se zaměřuje na to, co je v této souvislosti známo o *cis* a *trans* elementech uplatňujících se v regulaci genů kódujících různé složky fotosyntetického aparátu.

2. Reakce rostlin na sucho – hlavní signální dráhy a mechanismy regulace genové exprese

Hlavní úlohu signální molekuly v procesech krátkodobé i dlouhodobé aklimace rostlin na sucho a další faktory vyvolávající osmotický stres sehrává abscisová kyselina (dále jako ABA). Genetické studie rostlinných mutantů, jež byly dlouhodobě vystaveny nedostatku vody, jasně prokázaly hlavní roli syntézy abscisové kyseliny a signalizace s tím spojené při regulaci pohybů stomat vyvolaných suchem (Belin et Thomine, 2010). ABA tedy sehrává důležitou regulační roli ve vývoji rostliny v průběhu vodní deprivace (Vaseva et al., 2009). Během posledních desetiletí se ukázalo, že vegetativní pletiva mnoha rostlin, jež byly stresovány nedostatkem vody, vykazaly čtyřicetinásobné zvýšení hladiny tohoto fytohormonu již během několika hodin poté, co byl započat experiment, a následné snížení hladiny ABA po opětovném obnovení vodní rovnováhy (Rock, 2010). Krom toho je možné najít ještě celou řadu dalších funkcí, které ABA v rostlinném metabolismu zastává a reguluje: je aktivátorem některých proteinových kináz a fosfatáz, zodpovídá za dormanci pupenů, spouští signalizaci prostřednictvím druhých posílů nebo se podílí na kontrole přechodu do fáze kvetení. Receptory pro ABA byly překvapivě identifikovány i u některých živočišných skupin, především parazitických prvoků a žahavců. Většina těchto dalších uplatnění kyseliny abscisové však není pro účely a cíle této práce zajímavá, a proto se jim nebudu již dále věnovat.

V rostlinné říši existuje mnoho genů funkčně spjatých s reakcí na osmotické stresory, jejichž exprese závisí na syntéze a hladině ABA. Takové geny se souhrnně označují jako ABA-dependentní. Prozatím byly identifikovány nejméně dva typy regulonů, které jsou závislé na ABA a zároveň hrají úlohu v odezvě na abiotické stresory, a další dva typy takových, jež jsou nezávislé na ABA (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Mezi první skupinu se řadí AREB/ABF regulon a MYC/MYB regulon, k druhé pak CBF/DREB a NAC/ZF-HD regulony.

2.1. Regulon AREB/ABF

Většina prací, které studovaly cis-regulační elementy a s nimi spojené transkripční faktory v souvislosti s odpovědí rostlin na sucho, byla provedena na modelovém organismu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Mnoho lokusů genů, jejichž transkripce a tím i následná translace závisí na přítomnosti a hladině ABA, obsahuje

v oblasti promotoru *cis*-vazebný element označovaný jako ABRE (*ABA-responsive element*), jehož konsensus sekvence je PyACGTGGC. Pro úspěšné navázání ABA-dependentního transkripčního faktoru je však vyžadována přítomnost dvou těchto elementů za sebou v rámci sekvence jako v případě exprese genu RD29B (*Responsive to dehydration 29B*) ve vegetativních pletivech modelového organismu *Arabidopsis thaliana* (viz práce Nakashima et Yamaguchi-Shinozaki, 2006), nebo je nutná přítomnost tzv. spřahovacího elementu CE (*coupling element*), tedy sekvence, která podporuje vazbu transkripčního faktoru v oblasti promotoru. Takové elementy CE1 nebo CE3 jsou známy v případě genů HVA1 a HVA22 (viz práce Shen et al., 1996). Pokud se v promotoru vyskytnou dvě sekvence ABRE, může jedna z nich fungovat také jako spřahovací element (Belin et Thomine, 2010). V promotorech jiných genů, funkčně spojených s reakcí na abiotické stresory, lze vedle jedné sekvence *cis*-elementu ABRE též nalézt sekvenci elementu DRE/CRT (viz dále). Ta tu zřejmě rovněž zastává funkci spřahovacího elementu, tedy sekvence, která podporuje vazbu transkripčního faktoru v oblasti promotoru. Přitom platí, že kterákoliv kopie ABRE elementu nebo těchto alternativních elementů je nezbytná pro expresi genů citlivých na přítomnost ABA.

Bylo prokázáno, že transkripční faktor typu bZIP, stejně jako další ABRE-vazebné faktory (ABF) čili ABRE-vazebné proteiny (AREB) mohou aktivovat promotor stresorového genu RD29A (*Responsive to dehydration 29A*) prostřednictvím vazby na jeden z ABRE motivů (Boudsocq et Lauriere, 2005). Analýza cDNA izolované z *Arabidopsis thaliana*, kódující právě bZIP transkripční faktory označované jinak jako AREB nebo ABF, přinesla zjištění, že exprese genů kódujících faktory AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 a AREB3 byla pozitivně regulována díky přítomnosti ABA, dehydratací a také vysokou koncentrací solí (Uno et al., 2000). Rovněž tato starší studie, pracující s mutanty s poruchami v syntéze či vnímání ABA, hovoří o velmi utlumené aktivitě těchto transkripčních faktorů, naopak u mutant se zvýšenou citlivostí na ABA byla pozorována jejich zvýšená aktivita (Uno et al., 2000). Zatímco většina proteinů patřících do rodiny AREB/ABF a zahrnutých v signálních drahách nezávislých na ABA, je identifikovatelná ve vegetativních pletivech i semenech, proteiny AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 a ABF3 jsou u *Arabidopsis* exprimovány především ve vegetativních pletivech, ale nikoliv v semenech (Uno et al., 2000; Fujita et al., 2005; Nakashima et Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

Funkční složky regulonu AREB/ABF byly objeveny i u řady dalších rostlin, u nichž byla pozorována přirozeně zvýšená odolnost vůči abiotickým stresorům. V případě rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) byl u třech vybraných poddruhů, z nichž dva byly tolerantnější vůči stresu suchem, izolován protein o délce 447 aminokyselin, jehož sekvence vykazovala vysokou míru identity s proteinem AREB1, pocházejícím z *Arabidopsis*, a proto byl označen jako SIAREB1 (Yáñez et al., 2009). Dále bylo potvrzeno zvýšení míry exprese genu pro SIAREB1 poté, co byly rostliny dlouhodobě vystaveny dehydrataci, a následně zpětné snížení exprese po rehydrataci rostlin (Yáñez et al., 2009). V buňkách rostlin rýže (*Oryza sativa* L.) byl identifikován gen *OsABF1*, kódující stejnojmenný transkripční faktor typu bZIP. Analýza mutantních linií, u kterých byla cílenými insercemi uměle potlačena exprese tohoto genu, prokázala zvýšenou citlivost těchto mutantů na stres suchem a zvýšenou koncentrací soli (Hossain et al., 2010). V jiné studii byly připraveny transgenní rostliny salátu locika (*Lactuca sativa* L.), jimž byl do genomu vnešen gen pro transkripční faktor ABF3, izolovaný z *Arabidopsis*. Takto upravené rostliny byly pak prokazatelně odolnější vůči stresu suchem a chladem (Vanjildorj et al., 2005).

2.2. Regulon MYC/MYB

Nejen ABRE-like motivy genů indukovaných stresory jsou zahrnuty v regulaci prostřednictvím ABA. Některé studie provedené na *Arabidopsis* ukázaly, že transkripční faktory MYB a MYC jsou také součástí signální dráhy závislé na ABA, která vede k expresi genů souvisejících s odezvou na sucho jako *RD22* (Abe et al., 2003). V tomto případě se konkrétně jedná o proteiny AtMYC2 a AtMYB2, přičemž rozpoznávací místa pro faktory AtMYC2 a AtMYB2, která jsou součástí promotoru genu *RD22* (*Responsive to dehydration 22*), fungují také jako cis-elementy během exprese *RD22* indukované dehydratací (Abe et al., 2003). Tyto elementy obsahují konsensus sekvenci CACATG v případě MYC-vazebného elementu nebo sekvenci TGGTTAG v případě MYB-vazebného elementu. MYC a MYB transkripční faktory jsou syntetizovány až po akumulaci endogenní ABA, což ukazuje, že hrají roli v pozdní fázi rostlinných odpovědí na různé stresory (Nakashima et Yamaguchi-Shinozaki, 2010). Transgenní rostliny, produkující velké množství MYC a MYB faktorů, vykazovaly zvýšenou citlivost na přítomnost ABA, což prozrazovalo toleranci na osmotické stresory (Abe et al., 2003). Pozdější studie, opět pracující s mutantami v genech pro tyto transkripční faktory, naopak mluví o snížené citlivosti k ABA.

Před několika lety byla popsána přítomnost a funkce dalších proteinů rodiny MYC a MYB v souvislosti s regulací odpovědi rostlin na sucho. Rostliny *Arabidopsis*, u nichž byla uměle navozena zvýšená exprese transkripčního faktoru MYB15, byly znatelně citlivější k přítomnosti ABA a byla pro ně charakteristická také větší tolerance ke stresu suchem a vysoké koncentraci soli. (Ding et al., 2009). Tyto stresory pak podstatnou měrou zpětně regulovaly i míru transkripce a aktivity promotoru genu *MYB15*, přičemž tato zvýšená aktivita byla pozorovatelná jak ve vegetativních tkáních a reprodukčních orgánech, tak i ve svěracích buňkách stomat (Ding et al., 2009). Zároveň byla pozorována zvýšená míra exprese mnoha genů závislých na hladině ABA (*AtADH1* (*Alcohol dehydrogenase 1*), *AtEM6* (*Embryogenesis 6*), *RD22*, *RD29A*), včetně genů pro samotnou syntézu ABA (*ABA1*, *ABA2*) a pro přenos signálu ABA (*ABI3* (*Abscisic acid insensitivity 3*)), než u kontrolních rostlin vystavených stejným podmínkám (Ding et al., 2009). To může znamenat, že faktor MYB15 reguluje expresi nejen mnoha genů účastnících se poté odpovědi na environmentální stresory, ale že je schopen ovlivnit i expresi genů pro syntézu ABA a tím posílit expresi svého vlastního genu. Jiné proteiny řadící se k rodině faktorů MYB jsou schopné se vázat mimo jiné na promotory genů, jejichž proteinové produkty souvisejí s regulací cirkadiálních rytmů a průběhu fotosyntézy. Jim bude věnována jedna z dalších kapitol této práce.

2.3. Regulony nezávislé na kyselině abscisové

U některých rostlin byly identifikovány dráhy signální transdukce reagující na abiotické stresory, jejichž indukce ani průběh není nikterak spjat s ABA. Tyto signální dráhy jsou označovány jako nezávislé na ABA. Patří sem dráhy zahrnující aktivitu regulonů DREB/CBF a NAC/ZF-HD. Přestože překlad názvů jejich komponent napovídá často o spojitosti s reakcemi na sucho (např. DRE – *dehydration-responsive element*, tedy „element citlivý na dehydrataci“), jedná se zpravidla o historický artefakt a ve skutečnosti mají souvislost hlavně s dalšími abiotickými stresory, především s chladem, horkem a vysokým obsahem solí v půdě. Přesto se o nich v několika odstavcích zmíním, protože alespoň některé z nich se zřejmě podílejí i na regulaci odpovědi rostlin na sucho.

2.3.1. Regulon CBF/DREB

Regulon transkripčních faktorů rodiny CBF/DREB byl objeven krátce poté, co byly identifikovány první jemu příslušející *cis*-elementy v promotoru již zmiňovaného

genu *RD29A* (*Responsive to dehydration 29A*), indukovaného stresory sucha, chladu a vysoké salinity, kde se nachází spolu s jedním ABRE vazebným motivem. Tento nový element byl pojmenován jako *C-repeat/dehydration-responsive element*, zkráceně CRT/DRE, a charakterizován jako nezávislý na ABA (Saibo et al., 2009). Obsahuje motiv CCGAC, na nějž se vážou proteiny rodiny CBF/DREB, tedy *C-repeat binding* nebo též *DRE-binding* faktory. Přestože jsou faktory CBF/DREB1 uváděny především v souvislosti s odpovědí na stres chladem, pokusy, při kterých byla vyvolána vysoká míra jejich exprese, vykazaly jak u *Arabidopsis*, tak i u dalších modelových rostlinných organismů zvýšenou odolnost nejen na chlad, ale i sucho a zvýšenou salinitu. Různé studie prokázaly, že tato zvýšená tolerance na abiotické stresory, navozená uměle zvýšenou hladinou exprese genu pro CBF/DREB1, je spojena s dlouhotrvající účinností fotochemických procesů a fotosyntetickou kapacitou v porovnání s kontrolními skupinami stejných rostlin (Hsieh et al., 2002; Savitch et al., 2005 a Oh et al., 2005). Co se týká faktoru DREB2, ten je exprimován konstitutivně i bez působení stresorů, přestože jeho cílem jsou také promotorové oblasti genů zodpovědných za reakce na stres suchem, jako již zmíněných *RD29A* nebo *RD29B*. To poukazuje na pravděpodobnou aktivaci tohoto faktoru posttranslačními modifikacemi, jak bylo popsáno v práci Sakuma et al., 2006. V případě faktoru CBF3/DREB1A je dokonce znám jeho represor StZ/ZAT10, který s ním interaguje přes vazebný motiv DLN/EAR-like, nacházející se v oblasti blízko C-konce (Nakashima et Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Ten je zároveň schopen reprimovat některé geny, jejichž proteinové produkty jsou přímo nebo nepřímo zahrnuty v procesu fotosyntézy.

2.3.2. Regulon ZF-HD/NAC

Složky posledního z jmenovaných regulonů, ZF-HD/NAC (*zinc-finger homeodomain/NAM, ATAF and CUC*), sehrávají významnou úlohu především v časně reakci rostlin na sucho a také zvýšenou hladinu solí. Tento regulon je sice uváděn jako nezávislý na ABA, přitom se však ukázalo, že exprese genu pro tyto faktory může být zároveň indukována i zvýšením hladiny ABA. Geny rodiny NAC se totiž v rostlinné říši neúčastní pouze odpovědí na abiotické a biotické stresory, ale mají svou roli i ve vývoji a senescenci (Tran et al., 2004). V genomu *Arabidopsis* bylo dokonce nalezeno kolem 100 domnělých NAC genů (Ooka et al., 2003).

Cis-vazebné elementy příslušející transkripčním faktorům ZFHD a NAC, označované jako ZFHD rozpoznávaná sekvence (ZFHDRS) a NAC rozpoznávaná

sekvence (NACRS), hrají důležitou úlohu v expresi genu *ERD1* (*Early Response to Dehydration 1*) indukované dehydratací u *Arabidopsis thaliana* (Tran et al., 2006). V promotoru tohoto genu, který kóduje regulační podjednotku proteázy Clp, byl identifikován jednak MYC-like vazebný motiv (CATGTG) a poté i kompletní NAC rozpoznávaná sekvence, obsahující motiv CATGT a CACG, sloužící jakožto jádro DNA-vazebného místa (Tran et al., 2004). Transgenní rostliny, u nichž byla navozena zvýšená míra exprese genů pro oba transkripční faktory ZFHD1 a NAC, vykazaly vyšší odolnost vůči suchu než kontrolní rostliny. Tento efekt byl průkazně silnější v případě, kdy byl zvýšeně exprimován gen NAC samotný (Tran et al., 2006). U takto upravených mutantů, více odolávajících stresorům, je často pozorovatelný takzvaný trpasličí fenotyp, který se projevil pouze v případě, kdy byly exprimovány oba tyto geny současně, nikoliv však v případě zvýšené exprese pouze NAC. To zřejmě poukazuje na negativní efekt nadprodukce ZFHD1 na velikost rostlin (Tran et al., 2006). Souvislost s dopady na efektivitu fotosyntézy je prozatím nejasná.

Dráhy regulonu NAC byly objeveny i u jiných druhů rostlin než *Arabidopsis*. Exprese genu *OsNAC6*, identifikovaného v transkriptomu rostlin rýže, je indukována jak zvýšenou koncentrací ABA, tak samotnými abiotickými stresory (chlad, sucho a vysoká koncentrace soli). Dále může být indukována i přítomností kyseliny jasmonové, zraněním nebo při propuknutí choroby (Nakashima et al., 2009). Laboratorně navozená zvýšená míra exprese genu *OsNAC6* měla za následek růstovou retardaci a snížení výnosu, na druhou stranu přinesla zvýšenou odolnost rostlin vůči dehydrataci, vysoké koncentraci soli i rozvinutí nemoci (Nakashima et al., 2009). Naproti tomu zvýšená míra exprese genů kódujících jiné transkripční faktory typu NAC, *SNAC1* a *SNAC2* („*Stress-responsive NAC*“), byla příčinou zvýšené odolnosti vůči suchu i vysoké koncentraci soli, aniž by se zároveň projevila růstová retardace (Hu et al., 2008). Z toho je patrné, že NAC regulon má nejspíš, v porovnání s *Arabidopsis*, u rýže další funkce a i zde je zřejmě cílem regulace každého z těchto transkripčních faktorů hned celá řada genů, potažmo jejich promotorů, jež je nutno pro bližší pochopení těchto dějů identifikovat.

2.4. Proteinkinázy třídy SnRK2

Odpovědi na stres v důsledku sucha jsou zřejmě zprostředkovány mimo jiné i transkripční regulací genové exprese prostřednictvím reverzibilních proteinových fosforylačních dějů (Fujita et al., 2009). Ty jsou zabezpečovány proteinkinázami třídy

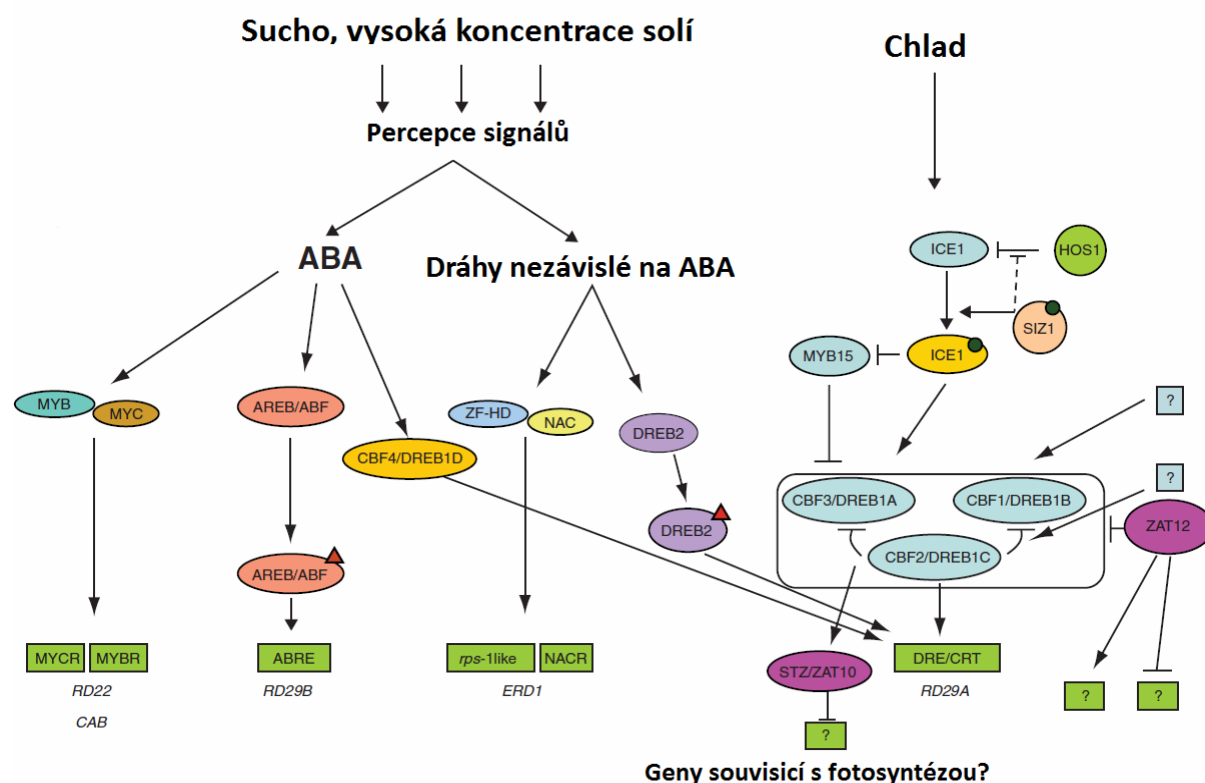
SnRK2 (*SNF1-related protein kinase 2*), jejichž kinázová aktivita je specifická pro transkripční faktory regulonu AREB/ABF, konkrétně u *Arabidopsis* jde o transkripční faktory skupiny bZIP. Tyto enzymy jsou také schopny zajistit regulaci otevírání stomat (Nakashima et al., 2009). Kinázová rodina SnRK2 u *Arabidopsis* obsahuje 10 členů, jež je možno rozdělit do tří podtříd podle sekvenční podobnosti (Mizoguchi et al., 2010). Většina z nich (kromě SRK2J a SRK2.9) je aktivována vysokou mírou osmolarity a 5 členů je, stejně jako zmíněné transkripční faktory, závislých na přítomnosti ABA a jsou tímto mediátorem přímo aktivovány (Boudsocq et al., 2004). Fosforylace proteinů skupiny AREB/ABF činností kináz SnRK2 je pro funkci těchto transkripčních faktorů esenciální. To dokázala recentní studie, v níž bylo u trojitých mutant *Arabidopsis srk2d/e/i* ve vegetativní fázi pozorováno drastické zhoršení exprese mnoha dříve identifikovaných genů závislých na signalizaci ABA (Fujita et al., 2009). Navíc analýza transkriptomů mutant *srk2d/e/i* a *areb1/areb2/abf3* ukázala, že 75 % cílových genů pro AREB/ABF regulační proteiny bylo pozitivně regulováno kinázami SRK2D/E/I. Tato data naznačují, že kinázy SRK2D/E/I regulují jak fosforylaci, tak i transkripci genu/proteinu AREB1 při odpovědi na stres nedostatkem vody, spojené se signalizací prostřednictvím ABA (Fujita et al., 2009).

2.5. Reakce rostlin na další abiotické stresory

Sucho, potažmo zvýšená koncentrace soli, nejsou jedinými abiotickými stresory, na něž umí rostlinná buňka efektivně reagovat. Abnormálně nízké nebo naopak vysoké teploty rovněž stimulují rostlinný organismus k expresi mnoha specifických genů, jež je podmíněna syntézou příslušných transkripčních faktorů. Často jde o proteiny patřící k některým z výše popsaných regulonů. Dobře prozkoumaný je především regulon CBF/DREB, jehož některé složky se účastní odpovědi na chlad. Jedná se o faktory rodiny CBF/DREB1, konkrétně DREB1B/CBF1, DREB1A/CBF3 a DREB1C/CBF2, které jsou ve zvýšené míře syntetizovány během stresu chladem (Nakashima et Yamaguchi-Shinozaki., 2010). Jejich cílem jsou promotory více než 40 různých genů, kódujících proteiny LEA (*late embryogenesis abundant*), KIN (*cold-inducible*) a osmoprotektivní proteiny fungující během biosyntézy složek buňky, které jsou také pravděpodobně zodpovědné za toleranci rostlin vůči chladu (Nakashima et Yamaguchi-Shinozaki, 2010). Dobře je také popsán způsob jejich regulace, kdy byla odhalena nejen poměrně bohatá síť negativních i pozitivních regulátorů, obsahující mimo jiné i několik SnRK2 proteinkináz nebo výše zmíněný protein MYB15, ale navíc se ukázalo, že CBF2/DREB1C

je negativním regulátorem exprese genů *CBF1/DREB1B* a *CBF3/DREB1A* (Novillo et al., 2004). Zdá se, že tyto tři DREB1 proteiny jsou hlavními transkripčními faktory zahrnutými v regulaci genové exprese indukované chladem, zatímco DREB2A a DREB2B jsou transkripční faktory účastníci se regulace genové exprese během působení stresu suchem a vysokou koncentrací solí (Nakashima et Yamaguchi-Shinozaki, 2010). Exprese genu pro protein HY5, který je schopen ovlivnit průběh a efektivitu fotosyntézy a jehož činnost bude popsána dále, je také indukována spíše extrémními teplotami než suchem, přičemž cílem jeho vazby může být i promotor genu pro faktor DREB2A (Saibo et al., 2009). Je tedy patrné, že regulační dráhy těchto faktorů, účastnících se odpovědi na různé abiotické stresory, nejsou funkčně oddělené a faktory typické pro jeden z regulonů hrajících roli v reakci na sucho mohou regulovat expresi genů pro faktory jiného regulonu nebo dokonce pro proteiny hrající roli v odpovědích na jiné abiotické nebo i biotické stresory.

Schéma současných znalostí o *cis* a *trans* elementech účastnících se odpovědi rostlin na sucho, případně na další abiotické stresory, znázorňuje obrázek č.1.



Obr. 1: Schéma signalizačních drah během působení abiotických stresorů u rostlin. Oválné rámečky značí transkripční faktory, obdelníkové rámečky *cis*-vazebné elementy v sekvenci DNA. Převzato a upraveno podle Saibo et al., 2009.

3. Reakce rostlin na sucho - regulace exprese genů spjatých s fotosyntézou

Jednou z nejrychlejších odpovědí rostlin na výkyvy ve vodní rovnováze je schopnost uzavírání stomat na povrchu listů (Belin et Thomine, 2010). Jelikož jsou stomata mimo jiné místem vstupu CO₂ do rostlinného organismu, má tato reakce přímý dopad na efektivitu Calvinova cyklu a tím i efektivitu celé fotosyntézy. Zde však stojí za zmínku, že pokud jsou rostliny vystaveny suchu a dostupnost CO₂ skrze listy je omezena, i aktivita Calvinova cyklu je zredukována, ale oba fotosystémy zpočátku zůstávají nadále aktivní. V důsledku sníženého odběru redukčních ekvivalentů Calvinovým cyklem však posléze dochází ke snížení dostupnosti konečného akceptoru elektronů, NADP⁺, což vede k nahromadění excitované energie ve fotosystémech (Saibo et al., 2009) a snížení aktivity fotosyntetického elektron-transportního řetězce. To vede i ke snížení aktivity ATP-syntázy v tylakoidních membránách a výsledkem je, že stres suchem do jisté míry inhibuje fotosyntézu prostřednictvím snížené dodávky ribulóza-1,5-bisfosfátu, která je způsobena nízkou dostupností ATP (Tezara et al., 1999). Dehydratace rostlinných buněk je citlivým faktorem pro syntézu ATP a pokles hladiny ATP má závažné důsledky pro buněčný metabolismus (Lawlor, 1995).

Krom samotné kontroly uzavírání stomat jsou některé druhy rostlin schopné pod vlivem abiotických stresorů regulovat i expresi genů, jejichž proteinové produkty jsou spojeny s metabolismem uhlíku a fotosyntézou, případně které přímo zastávají funkci enzymů Calvinova cyklu a proteinových komplexů fotosyntetického aparátu lokalizovaných v tylakoidech. Mezi tyto geny, jejichž exprese je do jisté míry řízena výkyvy prostředí, patří ty, jež kódují LHC (CAB) proteiny (*light-harvesting complexes* / chlorofyl a/b vazebné), podjednotky fotosystémů I a II a dále podjednotky komplexu Rubisco (Saibo et al., 2009). Přestože hlavním cílem rostlinného organismu je udržet aktivitu i efektivitu fotosyntézy i všech přidružených dějů na maximální možné úrovni nezávisle na působení okolních stresorů, je exprese většiny těchto genů během působení abiotických stresů prokazatelně snížena, zatímco jen u několika dalších byla pozorována pozitivní regulace exprese (Saibo et al., 2009). Promotory těchto genů, obsahující nečíslo vazebné motivy specifické pro některé regulony popsané výše, jsou často cílem pro vazbu transkripčních faktorů syntetizovaných převážně během zhoršených životních podmínek.

3.1. Transkripční faktory StZ a AZF

Takto fungují například transkripční faktory StZ a faktory skupin AZF, poprvé popsané v roce 2004 v práci Sakamoto et al. Proteiny StZ, obsahující dvě domény tzv. zinkových prstů, a AZF2 patří ke třídě transkripčních faktorů IIIA (Tian et al., 2009). Ukázalo se, že fungují převážně jako transkripční represory během stresu suchem, vysokou koncentrací solí a chladem (Sakamoto et al., 2004). Exprese genů StZ a AZF2 je indukována především v buňkách listů během stresu suchem, což podporuje hypotézu, že tyto geny mají úlohu v regulaci genů spojených s fotosyntetickými ději (Saibo et al., 2009). Dále bylo zjištěno, že jejich promotory obsahují jak DRE-vazebný element, tak i mnoho MYC- a MYB-rozpoznávaných sekvencí, které pak mohou fungovat jako cis-elementy během stresu suchem a vysokou koncentrací soli (Sakamoto et al., 2004). Z toho je patrné, že exprese těchto genů může být zprostředkovaně indukována i přítomností ABA. Krom toho bylo v těchto promotorech nalezeno mnoho krátkých repetitivních A (G/C)T, které jsou vhodné pro vazbu samotných StZ a AZF2 proteinů. Jelikož je i exprese StZ během stresu suchem přechodně velmi zvýšená, mohlo by to znamenat, že jde o tzv. „self-expresi“, tedy že gen ovlivňuje svou expresi svým vlastním proteinovým produktem (Sakamoto et al., 2004). Transgenní rostliny *Arabidopsis*, produkující značné množství faktorů CBF nebo zmíněných represorů StZ a AZF2, byly prokazatelně odolnější proti stresu suchem, zároveň se ale u nich projevila růstová retardace, která poukazovala na možnou represi genů zahrnutých v procesech fotosyntézy a fixace uhlíku (Saibo et al., 2009). Mechanismy této represe však zůstávají stále neodhaleny, avšak předpokládá se, že příslušné geny obsahují ve svých promotorech vazebné motivy pro tyto represory.

3.2. Transkripční faktory HvMCB

V případě genů kódujících světlosběrné proteinové komplexy fotosystému II, LHC (CAB) proteiny, bylo v minulosti identifikováno hned několik různých typů transkripčních faktorů, jež se specificky vážou do určitých míst promotorů těchto genů především během působení abiotických stresorů na rostliny. Jedná se o proteiny HvMCB1 a HvMCB2, které se vážou na specifickou oblast ležící -170 až -150 bp před samotnou sekvencí genu *CAB1*, která zastává funkci cis-elementu (Churin et al., 2003). Tyto faktory se řadí mezi MYB-like transkripční faktory, a to i přesto, že obsahují pouze jednu MYB repetici, zatímco pro ostatní členy rodiny R2R3 MYB proteinové rodiny je charakteristické, že obsahují tyto repetice dvě. Jejich vazba na promotory *CAB1* genu

je podpořena přítomností konzervovaných sekvencí bazických aminokyselin poblíž C-konce v místě vazby na DNA. (Churin et al., 2003). HvMCB1 obsahuje navíc i oblast kyselých aminokyselin na N-konci, která zřejmě zastává funkci transkripčně aktivační domény, jak bylo předtím prokázáno u kyselých domény na N-konci jiných MYB-like proteinů u kukuřice (Sainz et al., 1997). Ukázalo se, že zatímco exprese samotných CAB genů je úzce spojena s cirkadiálními rytmy a tedy fázemi světla a tmy, faktory HvMCB1 a HvMCB2 nejsou pro tuto expresi nezbytné a jejich exprese je naopak silně ovlivněna faktory prostředí: listy ječmene vystavené stresorům sucha a vysoké koncentrace soli vykázaly významné snížení transkripce genů pro HvMCB1 a HvMCB2 (Churin et al. 2003).

3.3. Transkripční faktor CCA1

Dalším transkripčním faktorem typu MYB, nesoucím pouze jednoduchou MYB repetici, je i protein CCA1, izolovaný z *Arabidopsis thaliana*, který se také váže na specifickou sekvenci promotoru CAB1 genu v oblasti mezi -221 a +7 od počátku transkripce (Andronis et al., 2008). Ten je spolu s dalším genovým produktem (HY5, DET1) zodpovědný za závislost exprese CAB genů na cirkadiálních rytmech (Maxwell et al., 2003). Zda je exprese samotného CCA1 regulována i environmentálními stresory, zůstává nezodpovězeno (Saibo et al., 2009).

3.4. Transkripční faktor HY5

Jiným takovým transkripčním faktorem regulujícím expresi CAB genů je protein HY5, který stejně jako CCA1 spoluzodpovídá za expresi genů CAB v závislosti na míře osvitu, ale zřejmě zároveň hraje roli i v reakci na jiné abiotické stresory (Saibo et al., 2009). Přitom schopnost vazby faktoru HY5 k promotoru CAB2 je do značné míry ovlivněna přítomností CCA1 proteinu, avšak komplex HY5-CCA1-DNA nebyl zatím identifikován (Andronis et al., 2008). Jde o transkripční faktor typu bZIP, který byl objeven také u *Arabidopsis*, kde pomáhá regulovat expresi mnoha dalších genů účastnících se odpovědi na abiotické stresory. Navíc zřejmě rovněž ovlivňuje expresi dalšího genu souvisejícího s fotosyntézou, a sice *RbcS1A*, tedy genu pro malou podjednotku komplexu Rubisco (Lee et al., 2007). To naznačuje, že tento protein může hrát významnou roli v regulaci celé fotosyntézy prostřednictvím regulace exprese mnoha jejích genů. Přestože pro to neexistují žádné přímé důkazy, předpokládá se, že exprese HY5 je indukována především extrémními teplotami (hlavně chladem, ale také horkem) spíše než ostatními typy stresorů (Saibo et al., 2009).

3.5. Transkripční faktor HRD

U *Arabidopsis thaliana* byl identifikován gen *HRD* (*HARDY*), kódující transkripční faktor typu AP2/ERF, při jehož zvýšené míře exprese se u rostlin zlepšuje schopnost využití vody a tím i poměr vyprodukované biomasy ku množství spotřebované vody, a to prostřednictvím zvýšené fotosyntetické asimilace a efektivity fotosyntézy a také redukce transpirace (Karaba et al., 2007). Rostliny exprimující tento gen ve zvýšené míře mají tlustší listy obsahující větší množství mezofylových buněk, obsahujících chloroplasty, a také více buněk pochvy cévních svazků, což zřejmě dále přispívá k vyšší efektivitě fotosyntézy (Karaba et al., 2007). Takové rostliny zároveň přežily mnohem delší období strádání nedostatkem vody a také větší koncentrace solí než kontrolní rostliny.

Dále byly připraveny transgenní rostliny rýže, do jejichž genomu byl zanesen gen *HRD*, izolovaný z *Arabidopsis*, přičemž i u nich byly poté pozorovány stejné fenotypové změny jako předtím u *Arabidopsis*. Při následných měřeních rychlosti výměny plynů se potvrdilo, že rostliny exprimující gen *HRD* si v porovnání s kontrolami udržují vyšší rychlost asimilace uhlíku, a to i při působení sucha. Zároveň nebyl pozorován prokazatelný rozdíl v efektivitě fotosyntetického aparátu mezi transgenními rostlinami během strádání vodou a kontrolními vzorky bez působení nedostatku vody, což indikuje, že strádání nedostatkem vody nezpůsobilo poškození reakčního centra fotosystému II (Karaba et al., 2007). Detailní mechanismy působení faktoru *HRD* i mechanismy regulace exprese jeho genu zatím zůstávají neobjeveny, dá se však usuzovat, že cílem tohoto transkripčního faktoru budou mimo jiné i geny spojené s fotosyntetickým aparátem.

3.6. Transkripční faktory DOF

Rovněž u C₄ rostlin byly nalezeny dráhy regulace exprese genů pro proteiny fotosyntetického aparátu, a to prostřednictvím specifických transkripčních faktorů typu C2C2-DOF. Protein Dof1 je považován za regulátor exprese genu pro fosfoenolpyruvátcarboxylázu (PEPC) (Yanagisawa, 2000). U modelového organismu kukuřice, typického zástupce C₄ rostlin, bylo prokázáno, že i tato regulace je zprostředkována vazbou faktoru Dof1 do specifického místa genu pro PEPC, čímž zvyšuje aktivitu tohoto promotoru a tím i expresi genu pro PEPC, zatímco tkáňově specifický transkripční faktor Dof2, jenž se váže do téhož místa v promotoru genu C₄PEPC, naopak aktivitu tohoto promotoru reprimuje a tím snižuje i míru exprese genu C₄PEPC (Yanagisawa et Sheen, 1998). Je zajímavé, že faktor Dof2, syntetizovaný

především buňkami stonku a kořene, má jak pozitivní, tak i negativní efekt na promotory různých genů za odlišných situací. To by mohlo znamenat, že kooperace těchto Dof proteinů může vytvořit mechanismy pro rozmanitou regulaci různých genů (Yanagisawa, 2000).

O roli faktorů Dof v regulaci genové exprese jako odpovědi na stimuly environmentálních výkyvů se prozatím mnoho neví. Recentní objev u *Arabidopsis* sice ukázal, že protein AtDOF4;2 je zahrnut v regulaci metabolismu fenylpropanoidů při vystavení rostlin chladu (Skirycz et al., 2007), ale to, zda jsou schopny měnit expresi cílových genů spjatých s fotosyntézou při působení různých typů abiotických stresorů, stále není známo.

3.7. Úloha transkripčních faktorů v ochraně fotosyntetického aparátu proti působení ROS

Jak bylo již výše zmíněno, během působení environmentálních stresorů na rostlinu bývá často důsledkem snížená aktivita Calvinova cyklu a tím i výsledná velmi malá koncentrace NADP⁺ jakožto konečného akceptoru elektronů. Nahromaděná energie na fotosystémech může být pak disipována do vedlejších biochemických cyklů jako fotorespirace nebo xantofylový cyklus. Častější je však situace, při které dochází k zvýšené produkci kyslíkových radikálů a dalších vysoce reaktivních molekul (zkráceně ROS) schopných poškozovat strukturu a tím i funkci mnoha buněčných proteinů, včetně klíčových enzymů fotosyntetického aparátu, a dalších makromolekul. Pozorována byla obzvláště interakce částic ROS s fotochemickým reakčním centrem fotosystému II (PSII), způsobující fotoinhibici. Rostlinná buňka však disponuje hned několika typy enzymů, které dokáží katalyzovat reakce, při kterých jsou tyto ROS molekuly přeměněny na stabilnější částice, a tím detoxifikovat buňku. Jedná se např. o enzymy superoxiddismutázu (SOD), různé peroxidázy (POD) a katalázu (CAT). Transgenní rostliny tabáku, produkující zvýšené množství transkripčního faktoru PtrABF izolovaného z rostlin rodu *Poncrius trifoliata* (L.) Raf., díky čemuž byly prokazatelně odolnější vůči stresu suchem, byly podrobeny studii, při níž byly sledovány koncentrace těchto jednotlivých enzymů před a po týdenním vystavení suchu. Již před vystavením suchu byly aktivity všech tří enzymů vyšší než u kontrolních vzorků, ale tento rozdíl nebyl nikterak výrazný (Huang et al., 2010). Konečné výsledky však potvrdily, že aktivita všech tří detoxifikačních enzymů byla průkazně vyšší u transgenních linií než u kontrolních rostlin, a to v nepřímém poměru k akumulaci částic ROS, přičemž při přezkoumání exprese

genů kódujících tyto enzymy byla míra jejich exprese značně vyšší u transgenních rostlin než u kontrolních vzorků již před započítím vodního deficitu. Expozice suchu pak vedla k indukci zvýšení exprese těchto genů u všech rostlin (Huang et al., 2010). Je tedy zřejmé, že rostliny disponují mechanismy, které při nedostatku vody či působení jiných stresorů zabezpečují zvýšenou syntézu detoxifikačních enzymů, čímž jsou do jisté míry schopny zamezit poklesu efektivity fotosyntetického aparátu a degradaci jednotlivých složek buňky, a to prostřednictvím nadprodukce určitých transkripčních faktorů. Z toho je možné vyvodit hypotézu, že i promotory genů pro tyto detoxifikační enzymy obsahují typické motivy (*cis*-vazebné elementy) vyhrazené pro navázání příslušných transkripčních faktorů souvisejících s regulací odpovědi rostlin na nedostatek vody.

4. Závěr

Ačkoliv měla tato práce poskytnout přehled o dosud známých poznatcích v oblasti regulace genové exprese pomocí *cis* a *trans* elementů jako odpovědi na abiotické stresory, především suchu, je z ní patrné, že existuje stále mnoho neznámých mechanismů, kterými rostlinné buňky oplývají a jež je ještě třeba rozluštit a detailně popsat. Tyto poznatky by se pak daly dobře využít v oblasti zemědělství při pěstování kulturních plodin za nepříznivých podmínek, jak napovídají první úspěšné pokusy s transgenními rostlinami. Téměř nic přitom není známo o regulaci exprese genů souvisejících s fotosyntézou jakožto nejdůležitějším procesem odehrávajícím se v rostlinách. Navíc je paradoxní, že zatímco daleko lépe probádanou oblastí je stres chladem, potažmo horkem, nemalá část světa v současnosti trpí spíše nedostatkem vody a v této oblasti většina informací dosud chybí. Proto je další studium regulace odezvy rostlinné buňky na molekulární úrovni během stresu suchem velmi perspektivním oborem.

5. Seznam použité literatury

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 67-78.

Andronis C, Barak S, Knowles SM, Sugano S, Tobin EM. 2008. The clock protein CCA1 and the bZIP transcription factor HY5 physically interact to regulate gene expression in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 1: 58-67.

Belin C, Thomine S. 2010. Water balance and the regulation of stomatal movements. In: Abiotic stress adaptation in plants (Eds.: A Pareek, SK Sopory, HJ Bohnert, Govindjee). Springer-Verlag, Berlin, 283-305.

Boudsocq M, Lauriere C. 2005. Osmotic signaling in plants: Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.* 138: 1185-1194.

Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C. 2004. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279: 41758-41766.

Ding Z, Li S, An X, Liu X, Quin H, Wang D. 2009. Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Genet. Genomics* 36: 17-29.

Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA-signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3470-3488.

Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50: 2123-2132.

Hossain MA, Lee Y, Cho JI, Ahn CH, Lee SK, Jeon JS, Kang H, Lee CH, An G, Park PB. 2010. The bZIP transcription factor OsABF1 is an ABA responsive element binding factor that enhances abiotic stress signaling in rice. *Plant Mol. Biol.* 72: 557-566.

Hsieh TH, Lee JT, Chang YY, Chan MT. 2002. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol.* 130: 618-626.

Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L. 2008. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol. Biol.* 67: 169-181.

Huang XS, Liu JH, Chen XJ. 2010. Overexpression of PtrABF gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in

tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. *BMC Plant Biol.* 10: 230.

Churin Y, Adam E, Kozma-Bognar L, Nagy F, Börner T. 2003. Characterization of two Myb-like transcription factors binding to CAB promoters in wheat and barley. *Plant Mol. Biol.* 52: 447-462.

Karaba A, Dixit S, Greco R, Aharoni A, Trijatmiko KR, Marsh-Martinez N, Krishnan A, Nataraja KN, Udayakumar M, Pereira A. 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of *HARDY*, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 15270-15275.

Lawlor DW. 1995. Effects of water deficit on photosynthesis. In: Environment and plant metabolism (Ed.: N Smirnoff). Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, 129-160.

Lee J, He K, Stolt V. 2007. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* 19: 731-749.

Maxwell BB, Andersson CR, Poole DS, Kay SA, Chory J. 2003. HY5, Circadian Clock-Associated 1, and a cis-element, *DET1 dark response element*, mediate DET1 regulation of *chlorophyll a/b-binding protein 2* expression. *Plant Physiol.* 133: 1565-1577.

Mizoguchi M, Umezawa T, Nakashima K, Kidokoro S, Takasaki H, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2010. Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. *Plant Cell Physiol.* 51: 842-847.

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiol. Plant.* 126: 62-71.

Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009. Transcriptional regulatory network in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol.* 149: 88-95.

Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2010. Promoters and transcription factors in abiotic stress-responsive gene expression. In: Abiotic stress adaptation in plants (Eds.: A Pareek, SK Sopory, HJ Bohnert, Govindjee). Springer-Verlag, Berlin, 199-216.

Novillo F, Alonso JM, Ecker JR, Salinas J. 2004. CBF2/DREB1C is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 3985-3990.

Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YJ, Nahm BH, Kim JK. 2005. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.* 138: 341-351.

Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Suzuki K, Kojima K, Takahara Y, Yamamoto K, Kikuchi S. 2003. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 20: 239-247.

Rock CD. 2010. Stress signaling 1: The role of abscisic acid (ABA). In: Abiotic stress adaptation in plants (Eds.: A Pareek, SK Sopory, HJ Bohnert, Govindjee). Springer-Verlag, Berlin, 33-73.

Saibo NJM, Tiago L, Oliveira MM. 2009. Transcription factors and regulation of photosynthesis and related metabolism under environmental stresses. *Ann. Bot.* 103: 609-623.

Sainz MB, Grotewold E, Chandler VL. 1997. Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. *Plant Cell* 9: 611-625.

Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol.* 136: 2734-2746.

Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, et al. 2006. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292-1309.

Savitch LV, Allard G, Seki M. 2005. The effect of overexpression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*. *Plant and Cell Physiol.* 46: 1525-1539.

Shen Q, Zhang P, Ho TH. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units, which are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8: 1107-1119.

Skirycz A, Jozefczuk S, Stobiecki M. et al. 2007. Gene network involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221-227.

Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401: 914-917.

Tian ZD, Zhang Y, Liu J, Xie CH. 2009. Novel potato C2H2-type zinc finger domain gene, StZFP1, which responds to biotic and abiotic stress, plays a role in salt tolerance. *Plant Biol.* 12: 689-697.

Tran L-SP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16: 2481-2498.

Tran L-SP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Co-expression of the stress inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERD1* gene in *Arabidopsis*. *Plant J.* 49: 46-63.

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 11632-11637.

Vanjildorj E, Bae TW, Riu KZ, Kim SY, Lee HY. 2005. Overexpression of *Arabidopsis* *ABF3* gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Cell* 83: 41-50.

Vaseva II, Grigorova BS, Simova-Stoilova LP, Demirevska KN, Feller U. 2009. Absciscic acid and late embryogenesis abundant protein profile changes in winter wheat under progressive water stress. *Plant Biol.* 7: 698-707.

Yanagisawa S, Sheen J. 1998. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 75-89.

Yanagisawa S. 2000. Dof1 a Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J.* 21: 281-288.

Yáñez M, Cáceres S, Orellana S, Bastías A, Verdugo I, Ruiz-Lara S, Caseretto JA. 2009. An abiotic stress-responsive bZIP transcription factor from wild and cultivated tomatoes regulates stress-related genes. *Plant Cell Rep.* 28: 1497-1507.